

Padronização da metodologia *dot*-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em saliva

Standardization of *dot*-ELISA methodology for detection of IgG antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in saliva

RIALA6/1666

Barbara Fialho Carvalho SAMPAIO*, Luciana Regina MEIRELES, Heitor Franco de ANDRADE JÚNIOR

*Endereço para correspondência: Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo. Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 05403-000. Tel: 11 3061-7010. E-mail: bcarvalho@usp.br

Recebido: 15.07.2015 - Aceito para publicação: 21.12.2015

RESUMO

O diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* é usualmente feito pelas técnicas sorológicas, mas a amostra (soro ou plasma) pode ser restrita em determinados grupos protegidos, em que a coleta de sangue é considerada agressiva e invasiva. Os anticorpos são encontrados em outros materiais biológicos, de coleta não invasiva, como a saliva. Os métodos de detecção de anticorpos no mercado estão padronizados para utilizar amostras de soro, e há metodologias alternativas de maior sensibilidade utilizando-se saliva, mas estas requerem equipamentos de difícil uso no campo. *Dot*-ELISA tem alta sensibilidade e leitura visual sem equipamentos, que facilita a execução de ensaio em campo utilizando-se técnica de triagem rápida e eficiente. Neste contexto, foi padronizado o *dot*-ELISA de alta sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em saliva e soro, utilizando-se amostras de 20 voluntários adultos. A sensibilidade e a especificidade do *dot*-ELISA padronizado foram semelhantes em soro e saliva, com exata distinção de amostras positivas e negativas, mesmo na ocorrência de baixas concentrações de anticorpos como na saliva. A saliva mostra ser material biológico adequado para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em estudos epidemiológicos da toxoplasmose em crianças ou outros grupos protegidos, em que a coleta de sangue é restrita.

Palavras-chave. toxoplasmose, saliva, imunoglobulina G, imunoenensaio, *dot*-ELISA.

ABSTRACT

The diagnosis of *T. gondii* infection is usually performed by serological tests, but the blood collection could be restricted in some groups as children. Antibodies are also found in other biological materials, such as saliva, whose sampling has been done by means of non-invasive procedure. Commercially available assays for performing antibody detection are standardized for analyzing serum samples. There are alternative techniques for detecting antibody in saliva, however they demand the use of equipment which is not easy to be used in field. *Dot*-ELISA is highly sensitivity and the results are of visual reading without any equipments, being available to be used in field studies, by means a rapid and efficient screening technique. Thus, a *dot*-ELISA with high sensitivity was standardized for detecting anti-*T. gondii* antibodies in saliva and serum by using samples from 20 adult volunteers. Sensitivity and specificity of the standardized *dot*-ELISA were similar in both saliva and serum samples, and precisely distinguishing the positive and negative samples, even in low antibody concentration-containing sample as saliva. Saliva showed to be as a potential biological material for detecting anti-*T. gondii* antibody in epidemiological studies on toxoplasmosis in children or other protected groups, where the blood collection is restricted.

Keywords. toxoplasmosis, saliva, immunoglobulin G, immunoassay, *dot*-ELISA.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença causada pelo coccídeo *Toxoplasma gondii* que apresenta alta infecciosidade e baixa patogenicidade em hospedeiros humanos com abrangência cosmopolita, afetando grande fração da população humana¹. A infecção é adquirida através da ingestão de oocistos, em solo, água ou presentes em frutas e verduras mal lavadas, cistos em carne crua ou malcozida e pela infecção transplacentária². Outras formas menos frequentes de adquirir a doença são transfusão sanguínea, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais³. O agente pode ser isolado durante a fase aguda da infecção ou em reativações em componentes orgânicos de diversos tipos, tais como sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva e medula óssea, assim como dos conteúdos coletados de infiltrados cutâneos, de manifestações exantemáticas, do baço e especialmente, de gânglios linfáticos, mas o isolamento é demorado e a detecção de ácidos nucleicos de sensibilidade variável⁴.

Assim, a principal ferramenta para o diagnóstico da toxoplasmose é a detecção de anticorpos no sangue. Diversas provas sorológicas foram preconizadas para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, como: reação de Sabin – Feldman⁵; reação de aglutinação do látex⁶; reação de fixação de complemento⁷; reação de hemaglutinação indireta⁸; reação de imunofluorescência indireta² e diversas reações imunoenzimáticas (ELISA) de diversos desenhos e revelações, além de *immunoblotting* ou *western blotting* e *dot-ELISA*⁹.

Todos os testes comerciais de detecção de anticorpos na toxoplasmose são desenhados para o uso de soro, que apresenta concentração alta e semelhante de IgG entre as amostras, mas sua coleta implica em pequena invasão do hospedeiro. Em estudos de incidência de doenças de alta prevalência e cicatriz sorológica, como a toxoplasmose¹⁰, o grupo alvo de detecção de incidência é o menos exposto ou recentemente exposto, ou seja, crianças e escolares pela pouca idade e tempo de exposição, já que a toxoplasmose é cosmopolita

e tem poucas regiões de baixa prevalência¹¹.

A saliva é um fluido específico proveniente da secreção das glândulas salivares como a parótida, submandibular, sublingual e glândulas menores, acrescida de substâncias oriundas do fluido crevicular gengival com IgG, secreções brônquicas ou nasais, células epiteliais descamadas, restos de alimentos, micro-organismos e produtos de seus metabólicos¹².

Como alternativa na detecção de IgG específica, a saliva pode oferecer a facilidade de coleta, de baixo custo e conforto ao paciente (principalmente crianças), além de ser um material de fácil manuseio nos procedimentos diagnósticos. Sua principal desvantagem é a quantidade variável de IgG e a necessidade de refrigeração¹³. Granade et al¹⁴ já preconizavam o uso da saliva para a detecção de IgG específico para rubéola e vírus da imunodeficiência humana tipo I, e Santos et al¹⁵ também demonstraram o potencial da saliva para o imunodiagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni*. Na toxoplasmose, a saliva foi eficiente para pesquisa de anticorpos IgA, IgM e IgG quando comparada a amostras pareadas de soro, usando *immunoblot* e aglutinação direta¹⁶. A presença de IgG anti-*T. gondii* em saliva foi demonstrada por *immunoblot*, com alta especificidade para triagem laboratorial da toxoplasmose¹⁷. Para investigar o potencial uso da saliva para detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, Loyola et al¹⁸ realizaram estudos epidemiológicos e de vigilância da toxoplasmose, demonstrando a aplicabilidade da detecção de anticorpos IgA na saliva como marcadores de toxoplasmose aguda em ensaios de ELISA.

O *dot-ELISA* tem sido descrito como um método diagnóstico eficiente para doenças infecciosas parasitárias como a esquistossomose¹⁹, a toxoplasmose^{20,21} e a angiostrongilíase²². Este teste é um método sensível, rápido, de baixo custo e de fácil aplicação na rotina laboratorial, permitindo a detecção de anticorpos em pequenas quantidades de amostra sem uso de equipamentos.

Normalmente, os estudos sorológicos têm utilizado a coleta de sangue, através de punção

clássica por agulha com produção de soro ou coletas de sangue total com lanceta e em papel filtro. Os dois materiais, com diferentes graus de pureza, são fontes de IgG específica, detectadas por testes de diferentes sensibilidades e especificidades, no caso da toxoplasmose humana.

Nossa alternativa foi o uso de saliva, que possuem IgG secretada, através de coleta simples seguida de concentração, o que permite a detecção de IgG específica contra o agente em diversos grupos. Por estas razões, otimizamos o teste dot-ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras pareadas de soro e saliva, trabalhando com uma saliva concentrada 10X como descrito em metodologia, permitindo resultados mais específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e antígenos

A pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde. Todos os voluntários trouxeram ou assinaram o TCLE, contendo todos os procedimentos a serem desenvolvidos, conforme a resolução nº 196/96, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos. Vale ressaltar que este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP e aprovado sob o processo nº 23109613.1.0000.0065.

Foram testadas 20 amostras de soro e saliva pelas técnicas de ELISA e dot-ELISA. Todas as amostras de soro foram validadas pelo teste comercial Elecsys Toxo IgG/IgM (Roche Diagnostics®, Somerville, NJ, USA), no setor de Imunologia da Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas – FMUSP. Das 20 amostras de soro validadas pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas – FMUSP, 4 amostras de soro foram positivas e 16 amostras de soro foram negativas. Os voluntários eram alunos de pós-graduação do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Suspensões de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidas no Laboratório

de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por meio de sucessivas passagens com intervalos de 3 a 4 dias, em camundongos *Swiss* não isogênicos, pesando em torno de 20 g, e com idade variando entre 30 e 60 dias. Os animais previamente infectados foram submetidos à eutanásia por narcose em câmara de CO₂ e o peritônio lavado com 5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2 (PBS) estéril contendo penicilina cristalina 2500 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL. Após quantificação em câmara de Neubauer, os parasitas foram diluídos apropriadamente em PBS e cada animal recebeu 10⁷ taquizoítos por inóculo intraperitoneal. A suspensão parasitária, obtida através do lavado peritoneal de animais infectados, foi purificada por filtração em membrana de policarbonato 5 µm (Millipore®) e centrifugada a 700 g por 10 min a 4 °C. Estes taquizoítos livres de células foram contados e estocados a -20 °C até o momento do uso. O extrato antigênico salino (antígeno salino²³) foi obtido de antígeno protéico solúvel de *T. gondii* com concentração de 3 x 10⁸ taquizoítos da cepa RH. O precipitado foi suspenso em 5 mL de água destilada submetido à sonicação (0,40 MHz, 4 Vdc) por 4 períodos de 30 segundos, em banho de gelo via sonicador de ponta Thornton®. Após certificação microscópica da lise total dos taquizoítos, foi acrescentado 5 mL de solução de NaCl 0,3 M sendo a suspensão centrifugada a 10.000g a 4 °C por 30 min, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403. O sobrenadante foi separado em alíquotas e mantidas à -70 °C até o momento de seu uso. Todas as reações foram realizadas com uma mesma partida de antígeno. O extrato antigênico alcalino (antígeno alcalino) foi obtido a partir de uma suspensão de 3 x 10⁸ taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* que foi tratada com 20 mL de NaOH a 0,15 M e mantida a 4 °C por 6 h. Em seguida, a solução antigênica foi neutralizada com HCl 0,3 M para o pH 7,5, e estocada em alíquotas a -20 °C. Para aumentar o rendimento também foi realizada a extração de antígeno de parasita por detergente suave, desoxicolato de sódio.

Extrato protéico solúvel por detergente desoxicolato de sódio (DOC): uma suspensão de 3×10^8 taquizoítos da cepa RH foi tratada com DOC nas concentrações de 0,1 % e 0,5 % em Tris-HCl. Após 30 min de incubação a 4 °C, a suspensão foi centrifugada a 10000g por 15 min a 4 °C e o precipitado descartado. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -20 °C.

As dosagens protéicas dos diferentes preparados antigênicos foram efetuadas empregando-se o método de Bradford²⁴. A qualidade do antígeno foi avaliada por eletroforese em poliácridamida²⁵, seguida de transferência para membranas e imunomarcção usando soro positivo humano, seguido de conjugado peroxidase anti-IgG humano, em condições convencionais²⁶. As membranas foram fotografadas para documentação. Utilizamos o mesmo antígeno em ambos os testes imunoenzimáticos, diferenciando-se apenas as concentrações antigênicas para cada metodologia.

Saliva

Para a intervenção da coleta de saliva utilizamos o que denominamos “kit coleta de saliva”, entregue a cada voluntário. Após a entrega do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, os voluntários eram conduzidos para a coleta da saliva. Era realizada a higiene da cavidade oral, com uso de 25-40 mL de enxaguante oral (Listerine®), de uso comercial, bochechos e 03 lavagens da cavidade com água potável sem aditivos. Sem qualquer outro estímulo, foi solicitado para que os voluntários completassem com saliva até a marca de 05 mL ou mais do tubo de coleta, na dependência da produção individual de cada um. Nenhum voluntário foi convidado a coletar mais saliva do que o necessário para o teste. Após a intervenção, os tubos coletados contendo a saliva eram colocados em banho de gelo para evitar perdas e mantidos assim até seu transporte e processamento no Laboratório de Protozoologia, no mesmo dia.

ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay)

A técnica foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por Venkatesan e Walklin²⁷. Placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação (Costar®) foram sensibilizadas com 100 µL/poço com proteínas de *T. gondii* em suas diferentes preparações. A leitura das densidades ópticas (D.O.) foi realizada em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm.

Dot-ELISA

A técnica de *dot*-ELISA foi executada segundo a metodologia descrita por Hakes e Armstrong⁹, com modificações realizadas pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical/USP, utilizando membrana de nitrocelulose (BioRad®), foram sensibilizadas com 50 µL/poço com antígeno solúvel de *T. gondii*, suspensos em tampão 0,1 M carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,5, nas concentrações de 0,5 µg/mL para triagem de amostras de soro e 1,5 µg/mL de antígeno para amostras de saliva, utilizando-se um sistema *dot blot* de 96 poços (BioRad®). Após sensibilização, as membranas eram retiradas do sistema *dot blot*, cortadas em tiras de aproximadamente 0,4 mm e colocadas em bandejas de incubação com canaletas de 10,5 cm x 5 mm (BioRad®), onde foram bloqueadas com Solução Salina Tamponada Tween Leite 5 % (SSTTL), por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 5 min com SSTTL 0,05 % sob agitação. Em seguida, foram aplicados volumes de 500 µL/canaleta de amostras de soro ou saliva, com incubação por 1 h sob agitação em temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes e foram aplicados 500 µL/canaleta do conjugado anti-IgG humano na diluição de 1/10.000, sendo as amostras incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes. A reação foi revelada utilizando-se como cromógeno o 3,3-diaminobenzidina (DAB), sendo aplicados 500 µL/canaleta da solução cromógena (10 µg DAB,

acrescido de 10 mL PBS e 15 µL de água oxigenada 30 %).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, co-positividade e co-negatividade, valores preditivos positivo e negativo, os intervalos de confiança de 95 % para proporções e a concordância entre testes (Índice Kappa) foram calculados pelo programa EpiInfo 6.04, usando a reação de ELISA como teste de referência. Os intervalos de confiança de 95 % e os índices relativos foram incluídos em todas as citações dada a amostragem reduzida.

RESULTADOS

Para padronização dos nossos testes, utilizamos 20 amostras de soro e saliva estocadas no banco de material biológico do Laboratório de Protozoologia do IMTSP. As amostras de soro foram submetidas ao teste convencional de ELISA e validados pelo Laboratório Central do HC-FMUSP, sendo considerado nosso padrão ouro para análise da sensibilidade relativa, especificidade relativa e valores preditivos positivos e negativos para o teste de dot-ELISA. Estas amostras foram ensaiadas na diluição 1/100 frente às diferentes preparações antigênicas como demonstrado na Figura 1A. Dos 20 soros testados, 4 foram reagentes ao *T. gondii* e 16 foram

não reagentes.

Utilizando o teste estatístico *t student*, verificamos que o antígeno salino apresentou os melhores resultados, com clara distinção entre amostras positivas e negativas.

A partir dos resultados obtidos no ELISA para as amostras de soro, realizamos uma eletroforese das diferentes preparações antigênicas de *T. gondii* para verificarmos o perfil dos antígenos de cada preparação. Como podemos observar na Figura 1B, o extrato protéico salino foi o antígeno que revelou um maior número de frações antigênicas, mantendo, portanto, um maior número de epítomos protéicos capazes de se ligarem aos anticorpos presentes nos soros, o que confirma os melhores resultados do ELISA para esta preparação. As demais preparações apresentaram um número menor de bandas, provavelmente, por perdas maiores de epítomos durante o processamento do antígeno. Contudo, é possível visualizar em todas as preparações, uma banda de 30 KDa, que corresponde à proteína (p30), a mais abundante na superfície de taquizoítos de *T. gondii*.

Assim, o ensaio de ELISA com extrato protéico salino foi considerado o teste padrão ouro para análise posterior dos resultados do dot-ELISA.

Inicialmente, padronizamos o ensaio de dot-ELISA em amostras de soro, onde a concentração de IgG específica é maior, facilitando a detecção dos anticorpos e, em

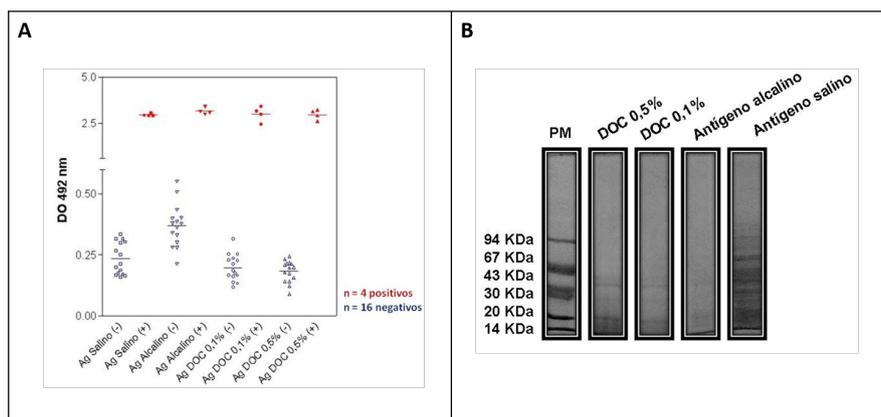


Figura 1. A - Resultados do teste imunoenzimático ELISA para amostras de soro humano. Os soros positivos estão representados em vermelho e os negativos em azul. As linhas representam as médias de cada grupo; B- resultados da eletroforese para as diferentes preparações antigênicas de *T. gondii*. PM = padrão de peso molecular

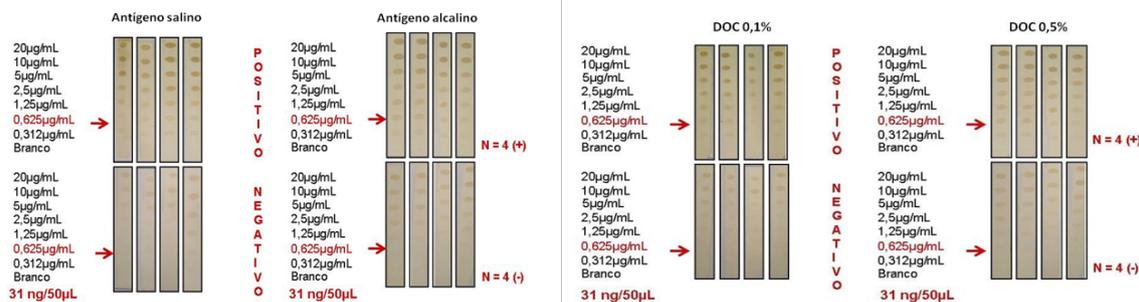


Figura 2. Resultados da padronização da concentração protéica do antígeno salino, antígeno alcalino, antígenos DOC 0,1 % e DOC 0,5 % para a reação de *dot*-ELISA em amostras de soro humano

seguida, partimos para a padronização da técnica em amostras de saliva. Embora o extrato protéico salino tenha fornecido os melhores resultados no ELISA, continuamos a trabalhar com as diferentes preparações antigênicas durante a padronização do *dot*-ELISA, a fim de obtermos o máximo de eficiência em nosso teste.

Para padronização da reação de *dot*-ELISA, utilizamos os soros na diluição 1/100, sendo as membranas de nitrocelulose sensibilizadas com diferentes preparações antigênicas em diferentes concentrações protéicas.

Como podemos observar na Figura 2, a concentração protéica ideal para todas as preparações antigênicas utilizadas no *dot*-ELISA para soro foi a de 0,625 µg/mL, que corresponde a 31 ng/50 µL, volume utilizado em cada poço da membrana no *dot blot* (Bio Rad®). Nesta concentração, foi possível distinguir claramente os soros positivos, com marcação (*dot*) bem definida, dos soros negativos, sem marcação visível ou com apenas uma pequena marcação de fundo sem definição, que corresponde ao *background* da reação.

Após padronização do *dot*-ELISA para soro, partimos para padronização da reação em amostras de saliva. Esta padronização foi realizada da mesma forma que a do *dot*-ELISA dos soros. Assim, podemos verificar na Figura 3 que a concentração protéica ideal em todas as preparações antigênicas foi a de 1,25 µg/mL que corresponde a 62 ng/50 µL, volume utilizado em cada poço da membrana no *dot blot* (Bio Rad®). Nesta concentração, foi possível

distinguir claramente as amostras de saliva positivas, com marcação (*dot*) bem definida, das amostras negativas, sem marcação visível ou com apenas uma pequena marcação de fundo sem definição, que corresponde ao *background* da reação.

Após padronização da concentração protéica ideal para as diferentes preparações antigênicas, avaliamos a reprodutibilidade intrateste da reação de *dot*-ELISA para saliva, através das marcações obtidas nos (*dots*) das quadruplicatas de cada saliva testada. Como podemos observar na Figura 4, os quatro (*dots*) da mesma amostra tiveram marcação semelhante, com mesmo grau de intensidade, confirmando a reprodutibilidade intrateste do *dot*-ELISA. Estes dados também

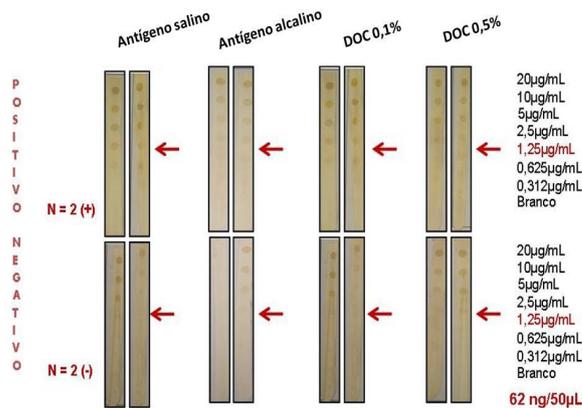


Figura 3. Resultados da padronização da concentração protéica para as diferentes preparações antigênicas utilizadas nas reações de *dot*-ELISA em amostras de saliva humana

podem ser confirmados nas Figuras 5A, 5B, 5C e 5D, que apresentam os resultados das quadruplicatas das amostras de saliva frente às diferentes preparações antigênicas. Já, para avaliar a reprodutibilidade interteste, comparamos as marcações (*dots*) das quadruplicatas de cada amostra, testadas em dias diferentes. Na Figura 4, podemos verificar uma boa reprodutibilidade dos resultados do primeiro e segundo teste, indicando que o dot-ELISA apresentou uma boa reprodutibilidade interteste.

Após padronização da concentração protéica ideal de antígeno, avaliamos 20 amostras de saliva com seus respectivos soros, estocadas no banco de

material biológico do laboratório de Protozoologia do IMSTSP. Estas amostras foram testadas por dot-ELISA em quadruplicatas frente às diferentes preparações antigênicas. A sensibilidade relativa, especificidade relativa e valores preditivos positivos e negativos, de cada antígeno, foram calculados no programa EpiInfo 6.04, utilizando o ELISA do soro como teste de referência.

Como podemos observar na Figura 5A, o teste dot-ELISA com antígeno alcalino apresentou resultados discordantes do teste ELISA para as amostras de saliva, com um resultado falso positivo e um resultado falso negativo, diminuindo assim a sensibilidade relativa do dot-ELISA, tendo uma sensibilidade relativa de 75 % e especificidade relativa de 93,8 %.

O dot-ELISA com antígeno DOC 0,1 % (Figura 5B), apresentou resultados discordantes do teste ELISA, tanto para as amostras de soro como saliva, sendo um resultado falso negativo e dois resultados falsos positivos para saliva e 13 resultados falsos positivos para soro, com isso a sensibilidade relativa foi de 75 % e a especificidade relativa de 87,5 %.

Para o dot-ELISA com antígeno DOC 0,5 %, a presença de resultados discordantes do teste ELISA foi ainda maior como podemos verificar na Figura 5C, com dois resultados falso negativo

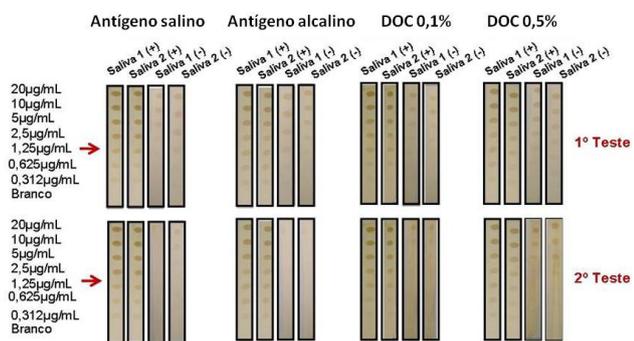


Figura 4. Resultado da reprodutibilidade da técnica dot-ELISA intrateste e interteste

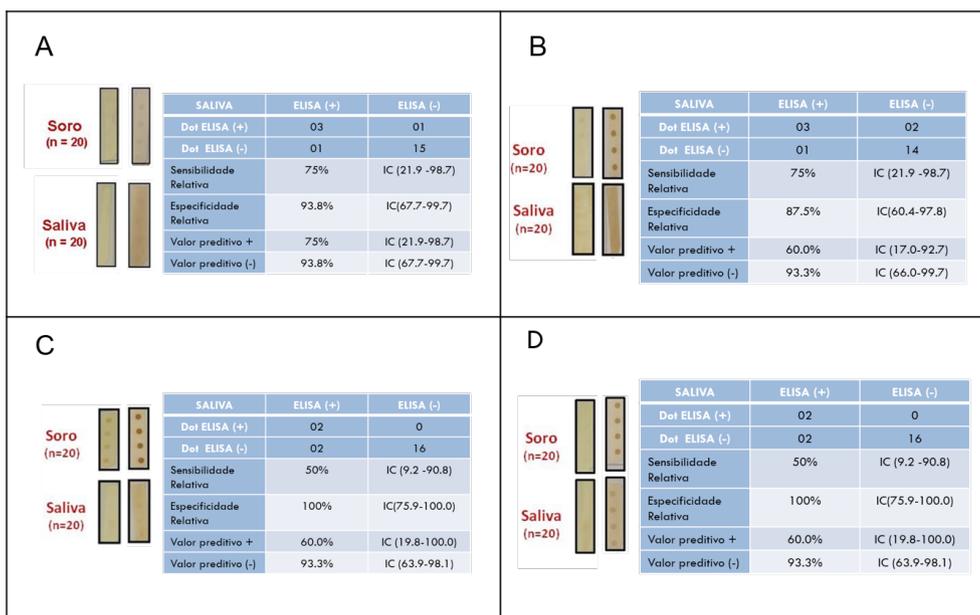


Figura 5. Resultados dot-ELISA com antígeno alcalino (A), dot-ELISA com antígeno DOC 0,1 % (B), dot-ELISA com antígeno DOC 0,5 % (C) e dot-ELISA com antígeno salino (D), para amostras de soro e saliva estocadas no Laboratório de Protozoologia – IMTSP

para soro e dois resultados falsos positivos para saliva e 13 resultados falsos positivos para soro, sendo assim a sensibilidade relativa foi de 50 % e a especificidade relativa de 100 %.

O *dot*-ELISA com antígeno salino (Figura 5D) apresentou resultados concordantes com o teste ELISA, tanto para as amostras de soro como de saliva, tendo uma co-positividade e co-negatividade em amostras de soro e saliva, com 100 % de sensibilidade relativa e 100 % de especificidade relativa, sendo o antígeno mais promissor para ensaios futuros.

DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que o ensaio imunoenzimático *dot*-ELISA foi capaz de detectar anticorpos IgG anti-*T. gondii* em saliva com a mesma eficiência de detecção em soro, material mais utilizado para este fim. Esta abordagem de coleta de saliva é extremamente importante para determinados grupos específicos de pacientes, como as crianças, que são, muitas vezes, protegidas da coleta invasiva convencional de sangue. Isto tem uma implicação muito importante para o diagnóstico das doenças infecciosas, em especial, da toxoplasmose, já que permite a utilização de um material de fácil obtenção, sem necessidade de métodos invasivos de coleta, como é o caso do sangue.

Esta abordagem também tem apresentado resultados positivos para grupos de indivíduos adultos, colaborando com a adesão dos pacientes em estudos, já que aumenta a confiança e a perseverança dos mesmos no tratamento, por não envolver sistematicamente a invasão pela agulha durante a consulta, evitando o absenteísmo²⁸.

Em nosso trabalho, padronizamos um ensaio de *dot*-ELISA com alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de IgG em pequenas quantidades de material, que é extremamente importante no caso da saliva, que apresenta baixa concentração de IgG. Outros autores já haviam relatado anteriormente a importância e aplicabilidade da reação de *dot*-ELISA para outras protozooses, mas para a toxoplasmose estes dados são escassos²⁹, sempre utilizando soro como fonte de anticorpos.

Na toxoplasmose, há relatos da utilização da saliva para detecção de anticorpos a partir de ensaios de ELISA e *immunoblotting*¹⁶⁻¹⁸, sendo o nosso trabalho pioneiro na utilização da técnica de *dot*-ELISA para saliva.

Nossos dados de padronização mostram que o extrato salino foi o antígeno que apresentou os melhores resultados no *dot*-ELISA, possibilitando uma clara distinção entre amostras positivas e negativas. Estes resultados são corroborados pelos dados descritos por outros autores^{20,29} que utilizaram o *dot*-ELISA com antígeno salino para detecção de IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro.

Estudos comparativos entre a eficiência de diferentes métodos de detecção de IgG anti-*T. gondii* em saliva são raros, mas os resultados do ELISA e do *dot*-ELISA do nosso estudo foram semelhantes aos descritos por Stroehle¹⁷ em um trabalho comparativo entre o ELISA e o *immunoblotting* para detecção de IgG anti-*T. gondii* em saliva, com valores altos de sensibilidade e especificidade, sendo estes resultados semelhantes aos descritos por Morris et al³⁰ em estudos de detecção de anticorpos IgG anti-rubéola em saliva.

Contudo, alguns autores relataram valores menores de sensibilidade e especificidade do *dot*-ELISA, propondo um aprimoramento do teste como demonstrado por Shukla et al³¹ em um estudo utilizando antígenos de *Cysticercus fasciolaris*, com 88 % de sensibilidade e 74 % de especificidade. Verificamos em nossos ensaios de padronização, que a concentração necessária de antígeno salino para detecção de IgG em saliva correspondeu ao dobro da concentração necessária para detecção no soro. Este dado pode ser explicado pelo fato da saliva total conter altos níveis de IgA secretora e baixos níveis de IgG. Além disso, a presença de bactérias, leucócitos, mucina, células epiteliais e restos de alimento podem provocar a degradação da IgG por proteases bacterianas e salivares, podendo, também, dificultar o processamento do material dada sua viscosidade³².

Em nosso trabalho obtivemos valores altos de sensibilidade relativa 100 % e especificidade relativa 100 % para o *dot*-ELISA com antígeno

salino em saliva. Estes dados são corroborados pelo estudo pioneiro em detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em saliva¹⁶, que utilizaram a técnica de *immunoblotting* com antígeno salino, muito similar ao nosso antígeno.

Nossos resultados demonstraram que o *dot*-ELISA com antígeno salino é um método excelente para o diagnóstico e triagem da toxoplasmose, utilizando tanto amostras de soro quanto de saliva, com altos valores de sensibilidade e especificidade. Stroehle et al¹⁷ ressaltam a importância da utilização da saliva como material por não ser um método invasivo, mas destacam que é necessário o aprimoramento das técnicas diagnósticas, bem como o processamento da saliva após sua obtenção, que é uma meta futura do nosso trabalho. Além disso, em estudos futuros iremos aprimorar o nosso teste, aumentando sua capacidade de detecção de IgG em saliva, através da utilização de *dot*-ELISA de captura com proteína A ou utilizando sistemas de revelação de maior sensibilidade.

CONCLUSÃO

Entendemos que os resultados advindos do aprimoramento do teste possam permitir, no futuro, o desenvolvimento e aplicação de um teste comercial para detecção de IgG anti-*T. gondii* em saliva, a semelhança do que é feito atualmente com o teste rápido para diagnóstico de indivíduos reagentes ao vírus HIV, a partir da detecção de IgG em saliva.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por LIM 49-HC-FMUSP, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

1. Amato Neto V, Marchi CR. Toxoplasmose. In: Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Editora Atheneu; 1999.p.159-78.
2. Camargo, ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1964;6(3):117-8.
3. Rynning FW, McLeod R, Maddox JC, Hunts S, Remington JS. Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. *Ann Intern Med*. 1979;90(1):47-9. [DOI: 10.7326/0003-4819-90-1-47].
4. Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*. 1995;110 (Suppl):S11-6. [DOI: 10.1017/S00311820000144X].
5. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948;108(2815):660-3. [DOI: 10.1126/Science.108.2815.660].
6. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):562-8.
7. Welch PC, Masur H, Jones TC, Remington JS. Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 1980;142(2):256-64. [DOI: 10.1093/infdis/142.2.256].
8. Balfour AH, Bridges JB, Harford JP. An evaluation of the ToxHA test for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human serum. *J Clin Pathol*. 1980;33(7):644-7.
9. Hakes TB, Armstrong D. Toxoplasmosis: problems in diagnosis and treatment. *Cancer*. 1983;52(8):1535-40. [DOI: 10.1002/1097-0142(19831015)52:8<1535::AID-CNCR2820520833>3.0.C.O.;2-I].
10. Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev Assoc Med Bras*. 2000;46(4):335-41. [DOI: 10.1590/S0104-4230200000400033].
11. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol*. 2008;38(12):1359-70. [DOI: 10.1016/j.ipara.2008.06.002].
12. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212. [DOI: 10.1177/154411130201300209].

13. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc*. 2006;34(4): 303-8.
14. Granade TC, Phillips SK, Parekh B, Pau CP, George JR. Oral fluid as a specimen for detection and confirmation of antibodies to human immunodeficiency virus type I. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995;2(4):395-9.
15. Santos MM, Garcia TC, Orsini M, Disch J, Katz N, Rabello A. Oral fluids for the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(3):289-92. [DOI: 10.1016/S0035-9203(00)90326-2].
16. Hajeer AH, Balfour AH, Mostratos A, Crosse B. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. *Parasite Immunol*. 1994;16(1):43-50. [DOI: 10.1111/j.1365-3024.1994.tb00303.x].
17. Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, Naguleswaran A, Hemphill A. Performance of a western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *J Parasitol*. 2005;91(3):561-3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-423R>].
18. Loyola AM, Durighetto Jr AF, Silva DAO, Mineo JR. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *J Oral Pathol Med*. 1997;26(4):187-91. [DOI: 10.1111/j.1600-0714.1997.tb00456.x].
19. Pinto PL, Kanamura HY, Silva RM, Rossi CRN, Andrade Jr HF, Amato Neto V. Dot-ELISA for the detection of IgM and IgG antibodies to *Schistosoma mansoni* worm and egg antigens, associated with egg excretion by patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1995;37(2):109-15.
20. Pappas MG, Lunde MN, Hajkowski R, McMahon J. Determination of IgM and IgG antibodies to *Toxoplasma* using the IFA test, ELISA, and Dot-ELISA procedures. *Vet Parasitol*. 1986;20(1-3):31-42.
21. Angel S, Maero E, Blanco JC, Pzsenny V, Zala C, Gonzolez R, et al. Early diagnosis of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients by Dot blot hybridization analysis. *J Clin Microbiol*. 1992;30(12):3286-7.
22. Eamsobhana P, Yoolek A, Punthuprapasa P, Suvouttho S. A dot-blot ELISA comparable to immunoblot for the specific diagnostics of human parascryptosporidiosis. *J Helminthol*. 2004;78(4):287-91.
23. Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun*. 1978;21(1):55-8.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54. [DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3].
25. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. [DOI:10.1038/227680a0].
26. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429-34. [DOI: 10.4103/1947-2714.100998].
27. Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitol Today*. 1993;9(6):228-32. [DOI: 10.1016/0169-4758(93)90020-G].
28. Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW, Dragavon J, Thomas KK, Brennan CA, et al. HIV testing in a high-incidence population: is antibody testing alone good enough? *Clin Infect Dis*. 2009;49(3):444-53. [DOI: 10.1086/600043].
29. Brooks RG, Sharma SD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* antigens by a dot-immunobinding technique. *J Clin Microbiol*. 1985;21(1):113-6.
30. Morris M, Cohen B, Andrews N, Brown D. Stability of total and rubella-specific IgG in oral fluid samples: the effect of time and temperature. *J Immunol Methods*. 2002;266(1-2):111-6. [DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00114-X].
31. Shukla N, Husain N, Agarwal GG, Husain M. Utility of *Cysticercus fasciolaris* antigen in dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. *Indian J Med Sci*. 2008;62(6):222-7. [DOI: 10.4103/0019-5359.41608].
32. Malamud D, Nagashunmugam T, Davis C, Kennedy S, Abrams WR, Kream R, et al. Inhibition of HIV infectivity by human saliva. *Oral Dis*. 1997;3 (Suppl 1):S58-63. [DOI: 10.1111/j.1601-0825.1997.tb00376.x].